

**Función plaquetaria y diagnóstico de enfermedad de von Willebrand.**

**Platelet function tests and von Willebrand Disease diagnosis**

## **Biología molecular en la enfermedad de von Willebrand. Estado actual y perspectivas**

**Molecular biology in von Willebrand disease.  
Current status and perspectives.**

**Woods AI<sup>1</sup>, Kempfer AC<sup>1</sup>, Paiva J<sup>2</sup>,  
Sánchez-Luceros A<sup>1,2</sup>, Lazzari MA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, IMEX-CONICET-ANM

<sup>2</sup>Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas  
"Mariano R Castex", Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

aiwoods@hematologia.anm.edu.ar



**TOPICOS  
DE LABORATORIO**

HEMATOLOGÍA  
Volumen 20 • Número Extraordinario  
XII Congreso CAHT:  
Septiembre 2016

**Palabras clave:** Enfermedad de von Willebrand,  
Fenotipo,  
Genotipo.

**Keywords:** Von Willebrand disease,  
Phenotype,  
Genotype.

### **Introducción**

El factor von Willebrand (VWF) es una glicoproteína que se sintetiza en células endoteliales (CE) y en megacariocitos. La estructura primaria del VWF está constituida por un monómero que, a través de dimerización y multimerización, forma multímeros de diferente peso molecular, pequeños (LMWM), intermedios (IMWM), grandes (HMWM) y extra grandes (ULMWM), algunos con un tamaño mayor a  $15 \times 10^3$  kDa<sup>(1)</sup>. La ADAMTS13 cliva a los ULMWM entre Y1605-M1606, generando formas menos activas. Se sintetiza en el retículo endoplásmico (pre-pro-VWF, de 2813 aminoácidos). Luego de su glicosilación, dimerización y multimerización, se llega a la proteína madura de 2050 aminoácidos que se almacena en los cuerpos de Weibel Palade de las CE y en los gránulos  $\alpha$  plaquetarios. El VWF promueve la adhesión plaquetaria al subendotelio, la agregación plaquetaria y es transportador del FVIII:C

en plasma, protegiéndolo de su degradación por parte de proteasas<sup>(2)</sup>. Además, disminuye la inmunogenicidad de los concentrados de FVIII/VWF y protege al FVIII de su neutralización por anticuerpos.

El gen que codifica para el VWF está localizado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.3), involucra 178 kb de ADN genómico organizado en 52 exones cuyos tamaños varían entre 41 pb (exón 40) y 1,3 kb (exón 28)<sup>(3)</sup>. Se ha identificado un pseudogen en el cromosoma 22, cuya función se desconoce, que posee 97% de homología entre los exones 23 y 34 del gen VWF<sup>(4)</sup>.

### **Nomenclatura de los genes y proteínas**

La Organización del Genoma Humano y el Comité de Nomenclatura Genética (HUGO) han estandarizado los nombres de los genes (HGNG) y las proteínas relacionadas. Así, los nombres de los genes se identifican con mayúscula, *itálica* y números ará-

bigos (*VWF*, *F8*, *VWFP* y *GPIBA*), y las proteínas, *VWF*, *FVIII*, pseudogen y *GPIbα*. La Sociedad de Variación del Genoma Humano (HGVS) establece que todos los genes y proteínas se enumeran desde la primera A del codón de iniciación ATG (A= +1) del ADN complementario, donde la metionina es el aminoácido #1. Cada tipo de secuencia tiene una letra prefijo que denota a qué se refiere; así, c. simboliza al ADN complementario, g. al ADN genómico y p. a la proteína.

### Análisis genotípico

El desarrollo de técnicas de PCR para la búsqueda de mutaciones se presenta como el aporte más novedoso en este campo. No sólo son útiles para confirmar la presencia de algunos subtipos, sino que ayudará a llegar a diagnósticos en casos difíciles de resolver y probablemente arroje una nueva luz en la tarea de simplificar la actual clasificación de la VWD. Desafortunadamente, el gran tamaño del gen *VWF* y la alta frecuencia de variaciones o polimorfismos (SNP) no patológicos limita la utilidad del diagnóstico genético. Además, no todos los pacientes tienen mutaciones identificables, en especial los tipo 1. Por otro lado, las grandes deleciones del gen *VWF* que se refleja en *VWF* muy disminuido o ausente, no son identificadas por los métodos de secuenciación convencionales<sup>(5)</sup>.

El análisis genotípico se realiza mediante la secuenciación directa (método de Sanger) de los fragmentos de interés, previamente amplificados por técnicas de PCR. Se pueden utilizar métodos de chequeo como el *Conformation Sensitive Gel Electrophoresis* (CSGE) que permite el chequeo rápido de varios exones. Si bien éste último es sencillo y económico, por su limitada sensibilidad hay que validarlo mediante la secuenciación del exón de interés; en nuestra experiencia, los exones 17 al 27 pueden estudiarse por este método, a excepción de los exones 22<sup>(6)</sup> y 28, en el caso de éste último debido a su gran tamaño y a la presencia de numerosos SNP. Al no discriminar entre mutaciones y SNP, los exones que muestran un patrón electroforético de doble banda deben secuenciarse.

Si bien el estudio de exones por secuenciación es lo indicado para el diagnóstico de los VWD tipo 2, para estudiar los VWD3 puede ser necesaria otras estrategias para detectar formas heterocigotas. En estos casos se utilizan PCR cuantitativa o MLPA

(*multiplex ligation-dependent probe amplification*)<sup>(7)</sup> o *mutation-specific gap PCR*<sup>(8)</sup>.

### Polimorfismos del gen VWF

Una de las características para distinguir entre mutaciones y SNP, es la frecuencia alélica. Se consideran SNP a las variantes en la secuencia nucleotídica que están presentes en la población general en más del 1%. Estas variaciones pueden ser muy raras en algunas poblaciones pero muy frecuentes en otras. Dado que la frecuencia de la VWD en la población general es de alrededor del 0,8%-1,3%, el significado de variaciones desconocidas puede ser un problema<sup>(9,10)</sup>. Más aún, si tenemos en cuenta que el *VWF* es una proteína altamente polimórfica, es más difícil distinguir SNP que causen enfermedad de aquéllos que pueden ser benignos. Esto puede resolverse mediante análisis funcional, por estudios familiares, o por la identificación de la variación en varios individuos sin evidencias de laboratorio ni clínicas de VWD. La Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (ISTH), en la base de datos de su página web (<http://www.ragtimedesign.com/vwf/>) recopila los diferentes SNP y mutaciones reportados hasta ahora, que abarcan todo el gen *VWF*. En dicha base hay reportadas 250 entradas de SNP, cada una proveniente de diferentes grupos de trabajo y de diferentes grupos étnicos, describiendo 181 SNP diferentes. Algunas variantes alélicas pueden afectar sólo las determinaciones de laboratorio sin afectar el fenotipo, como es el caso de la p.P1467S<sup>(11)</sup>. El mismo autor<sup>(12)</sup> ha reportado la presencia de 3 SNP en el exón 28 asociados con disminución significativa del *VWF:RCo/VWF:Ag* en individuos sanos afroamericanos (p.Ile1380Val, p.N1435S y p.D1472H). De éstos, sólo la presencia de p.D1472His se asoció a dicho cociente disminuido tanto en controles caucásicos como en afroamericanos. Es posible que este SNP disminuya la interacción entre *VWF-GPIbα* mediada por ristocetina. El rol de p.I1380V y p.N1435S no está definido, dado que no se hallaron individuos con estos SNP en ausencia de p.D1472H; esto puede reflejar ligamiento con éste último. Bellisimo y col.<sup>(13)</sup> estudiaron 184 individuos normales sin historia personal de sangrado, incluyendo 35,9% de afroamericanos. En este grupo étnico encontró alto porcentaje de SNP. En este estudio se enfatiza la importancia de secuenciar controles sanos de diferentes etnias, de manera tal de no malinterpretar

como mutaciones a variaciones asintomáticas presentes en una etnia y ausente en otra. En un trabajo reciente, la Database 1000 Genomes UK Project demostró 2728 SNP y 91 ins/dels en el gen *VWF*, con la más alta variabilidad étnica en africanos, seguida de asiáticos<sup>(14)</sup>. La secuenciación de controles sanos en distintos grupos étnicos es crucial para entender el significado de nuevas variantes nucleotídicas, en especial frente a la presencia de mezcla racial/étnica importante, como es el caso de nuestra sociedad. Otros SNP, los p.V1565L y p.G1643S, se asocia-

ron con aumento de la proteólisis por ADAMTS13, mientras que p.D1472H, p.Q1571H y p.P1601T con resistencia a la proteólisis<sup>(15,16)</sup>.

### Mutaciones del gen VWF en los diferentes dominios

Se han descrito muchos tipos diferentes de mutaciones, que se detallan en la **tabla 1**. Las mutaciones de tipo *missense* (sentido equivocado) son las más frecuentes. Según la localización del cambio nucleotídico será el dominio afectado y, por ende, el fenotipo resultante.

**Tabla 1.** Tipos de mutaciones responsables en la enfermedad de von Willebrand

Tipo de mutación	Proceso alterado	Alteración resultante	Tipo de VWD
Transcripcional	Transcripción del RNAm.	Sitios de transcripción alterados, con reducción o ausencia de síntesis del ARNm.	Tipo 1.
Empalme	Remoción de intrones.	Alteración de nucleótidos CT y AG o nucleótidos adyacentes en los extremos 5' y 3' de cada intrón: pérdida de exones o retención del intrón.	Alelos nulos responsables de tipo 3 recesivo, 2N, 2A y tipo 1.
		Pérdida de exones que llevan a delecciones sin cambio en el marco de lectura y a una proteína acortada, anormal.	Tipo 1 dominante y 2A.
Sin sentido	Traducción de la proteína.	Secuencia nucleotídica alterada con generación de codón de terminación.	Alelos nulos responsables de tipo 3 recesivo, 2N, 2A y tipo 1.
Pequeñas ins/dels, delecciones, y duplicaciones	Alteración del ARNm o la traducción de la proteína.	Cambio del marco de lectura, probable generación de codón de terminación.	Alelos nulos responsables de tipo 3 recesivo, 2N, 2A, tipo 1.
		Pérdida o ganancia de tripletes.	Tipo 1, 2A, 2B, 2M.
Conversión génica	Producción de ARNm o traducción de proteína.	Reemplazo de secuencia del VWF por la del seudogen (VWFP), con cambios sin sentido (aparición de un codón de terminación) o con sentido equivocado.	Tipo 1, 2B, 2M, 3.
Grandes delecciones	Producción de ARNm o traducción de proteína.	Ausencia de uno o varios exones, o de todo el gen. Ausencia de síntesis proteica, desde donde se interrumpe la codificación de aminoácidos.	Tipo 3 recesivo y tipo 2A.
		Pérdida de tripletes.	Tipo 1, 2 no clasificada, 3.
Sentido equivocado	Traducción de la proteína.	Reemplazo de un aminoácido por otro. Efecto dependiente de la posición y naturaleza del aminoácido reemplazado.	Tipo 1, 2A, 2M, 2B, 2N tipo 3.

### Dominio D1-D2

Se extiende desde el exón 2 al exón 17. Contiene el sitio de corte de la furina, enzima que separa el propéptido de la proteína madura, entre los residuos p.R763-S764. Mutaciones en esta región pueden provocar la persistencia del propéptido.

### Dominio D'D3

Se extiende desde el exón 18 al comienzo del exón 28. Es la región de multimerización de los dímeros del VWF y además responsable de la unión del FVI-II al VWF. Por lo tanto, mutaciones en esta región son responsables del VWD2A y VWD2N. El VWF contiene 8,2% de residuos cisteína (Cys), muchos

de ellos involucrados en la formación de puentes S-S inter o intra cadenas, que son importantes para la integridad funcional del VWF, tanto en el proceso de dimerización, como en el de multimerización<sup>(17)</sup>. Muchas de las mutaciones localizadas en esta región que involucran residuos Cys alteran o impiden la multimerización mediada por uniones S-S inter cadenas<sup>(18)</sup> y alteran el normal plegamiento del VWF mediada por uniones intra cadenas<sup>(19)</sup>, o pueden resultar en sobrevida reducida del VWF, por aumento de la depuración y sin aumento de proteólisis por ADAMTS13<sup>(20)</sup>.

### **Dominio A1**

Abarca desde los aminoácidos Q1238 a P1471 en el exón 28. Las mutaciones localizadas en el dominio A1 se caracterizan principalmente por alterar la afinidad del VWF por la GPIb $\alpha$  plaquetaria, siendo responsables de dos fenotipos claramente diferenciados: en un caso, están aquellas que producen una pérdida de función del VWF al disminuir la unión VWF-GPIb $\alpha$ , cuyo fenotipo corresponde al VWD2M, y aquellas que producen el efecto opuesto, esto es, ganancia de función al aumentar la afinidad del VWF por GPIb $\alpha$ , cuyo fenotipo es VWD2B. Hemos descrito que las mutaciones localizadas en este dominio y asociadas al VWD2M son responsables de un fenotipo de sangrado más severo que las localizadas en el dominio A2<sup>(21)</sup>.

### **Dominio A2**

Abarca desde los aminoácidos G1481 a R1668 en el exón 28. La mayoría de las mutaciones localizadas en el dominio A2 alteran la estabilidad de dicho dominio, aumentando su susceptibilidad a la ADAMTS13<sup>(22)</sup>. El mecanismo puntual que produce este efecto aún no se ha dilucidado a nivel molecular. El sitio catalítico Y1605-M1606, localizado en este dominio, se encuentra en el interior de la proteína, por lo que se necesita el desplegamiento o desnaturalización del mismo para su reconocimiento apropiado<sup>(23)</sup> y posterior clivaje por la ADAMTS13<sup>(24,25)</sup>, ya sea por el alto *shear stress* (tensión de cizallamiento) del flujo sanguíneo o por su reducción *in vitro* por métodos químicos (tratamiento con urea).

### **Dominio A3**

Abarca desde los aminoácidos S1671 en el exón 28 al G1874 en el exón 32. Se han descrito mutaciones en este dominio que alteran la unión del VWF a los colágenos tipos I y III<sup>(26)</sup>.

### **Dominio CK**

Abarca los últimos 90 aminoácidos del VWF (exón 52), y es donde se realiza el proceso de dimerización del VWF. Este dominio contiene 11 residuos Cys. Las mutaciones que comprometen residuos Cys conducen a una deficiencia recesiva y cuantitativa si la unión S-S afectada es intra cadena, y a un defecto cualitativo dominante-negativo si la S-S afectada es inter cadena<sup>(27)</sup>. Se han identificado mutaciones en este dominio que alteran la dimerización, en pacientes con VWD2A<sup>(28)</sup>.

### **Mutaciones asociadas a conversión génica**

Se trata de mutaciones de tipo *missense* que resultan de secuencias del pseudogen (*VWFP*) que reemplazan a los nucleótidos propios del gen *VWF*. El resultado fenotípico dependerá de la zona comprometida por el reemplazo<sup>(29)</sup>. Las más frecuentes se ubican dentro del extremo 3' del exón 27 y el 5' del exón 28, aparentemente por la presencia de 2 secuencias "*chi*" o "*like chi*" (intrón 27 y exón 28). Los fenotipos resultantes de conversión génica descriptos son VWD tipo 1 y tipo 3.

### **Mutaciones según la variante de VWD**

#### **Mutaciones asociadas al tipo VWD1**

Dos mecanismos diferentes son responsables de este fenotipo: a) la depuración acelerada (sobrevida acortada del VWF), donde el VWFpp/VWF:Ag es anormalmente alto y los niveles del VWF post desmopresina son insuficientes, variante conocida como tipo 1C; en este subtipo debemos mencionar a la variante Vicenza, cuya mutación responsable es la p.R1205H<sup>(30)</sup> y b) la retención intracelular del VWF, con disminución de la secreción, probablemente por alteración del plegamiento normal del VWF<sup>(31)</sup>. La mayoría de las mutaciones demuestran penetrancia incompleta. Se ha descrito que sólo cerca del 35% de los pacientes tipo 1 tiene mutación identificada, y que la presencia de mutaciones sólo es común en pacientes con VWF:Ag < 20-39 UI/dL<sup>(32)</sup>. Esto, relacionado a que más del 70% de los pacientes tienen grupo sanguíneo O, podría explicar los niveles disminuidos de VWF con la ausencia de mutaciones<sup>(33)</sup>. Las mutaciones asociadas a esta variante se han descrito a lo largo de todo el gen *VWF*.

#### **Mutaciones asociadas al tipo VWD3**

Si bien el diagnóstico del tipo 3 es relativamente fácil, a través de los resultados fenotípicos que muestran la virtual deficiencia completa del VWF,



el estudio genético es más complicado, dado que las mutaciones asociadas a esta variante se localizan a lo largo de todo el gen *VWF*, lo que hace que el estudio sea largo y costoso. Se caracteriza por la presencia de mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas<sup>(34)</sup>, aunque también se han descrito mutaciones *non-sense* (sin sentido), mutaciones en sitios de *splicing* (empalme), ins/dels que producen aparición de codón de terminación, pequeñas y grandes deleciones, éstas últimas asociadas al desarrollo de inhibidores.

#### **Mutaciones asociadas al subtipo VWD2A**

Las mutaciones responsables de este subtipo incluyen cambios *missense*, deleciones e inserciones que producen cambio del marco de lectura. El 73% de estas mutaciones se localizan en el exón 28, siendo el 90% mutaciones *missense*, con carácter que puede ser recesivo o dominante<sup>(35)</sup>. Las mutaciones en el dominio D2 son recesivas e impiden una adecuada multimerización; las localizadas en los dominios D3, A1, A2 y CK son dominantes; las ubicadas en los dominios D3 y CK inhiben la multimerización y dimerización, respectivamente<sup>(36,37)</sup>. Las mutaciones en los dominios A1 y A2 resultan en un incremento en la susceptibilidad a la proteólisis por ADAMTS13, biosíntesis alterada o retención intracelular<sup>(38)</sup>. Las mutaciones que causan defectos en la síntesis, depósito y retención intracelulares son Grupo I<sup>(39)</sup> y las que aumentan la susceptibilidad a la ADAMTS13 son Grupo II. Las mutaciones Grupo I tienen un fenotipo más severo y las mutaciones Grupo II responden mejor al tratamiento con DDAVP<sup>(40)</sup>.

#### **Mutaciones asociadas al subtipo VWD2M**

Las mutaciones responsables de este fenotipo son dominantes; el 75% están localizadas en el dominio A1 (exón 28), en la región de unión a la GPIb plaquetaria<sup>(41)</sup>; 93% de las mismas son de tipo *missense* y las restantes son de tipo de cambio del marco de lectura. También hay un pequeño número de mutaciones en el dominio A3, que afectan la unión del VWF al colágeno y causan sangrado leve<sup>(25)</sup>.

#### **Mutaciones asociadas al subtipo VWD2B**

Las mutaciones responsables de este fenotipo están localizadas en el dominio A1 (exón 28). Hasta ahora, se han identificado 25 mutaciones diferentes responsables de este fenotipo, todas de tipo *missense*, cuya forma de herencia es dominante.

Las mutaciones más frecuentes son: p.R1306W,

p.R1308C, R1341Q, p.V1316M, siendo ésta última la más estudiada. El cuadro fenotípico de los pacientes depende de la mutación responsable en cada caso<sup>(42)</sup>. Federici y col.<sup>(43)</sup> demostraron que pacientes con p.H1268N, p.R1306W, p.R1308C, p.I1309V, p.V1316M y p.R1341Q/W tienen trombocitopenia después de situaciones de estrés, no así los pacientes con p.P1266L o p.R1308L, y que la p.V1316M es la que se asocia con sangrado (*bleeding score*) más severo entre las mutaciones responsables del subtipo VWD2B.

#### **Mutaciones asociadas al subtipo VWD2N**

Dada la herencia aparentemente recesiva de este subtipo, se necesitaría la presencia de mutaciones homocigotas, o dos mutaciones en heterocigosidad, o mutaciones heterocigotas más un alelo nulo para diagnosticar VWD2N<sup>(44)</sup>. Sin embargo, nosotros hemos descrito la presencia de la mutación p.R854Q en heterocigosidad, con fenotipo clínico y de laboratorio compatible con VWD2N sin mutaciones asociadas<sup>(45)</sup>.

Se han descrito mutaciones localizadas entre los exones 17 al 27, aunque la mayoría (85% de los reportes) se localizan entre los exones 18 al 24. La p.R854Q es una de las más frecuentes. También se reportó que la presencia de mutaciones en el exón 17 como la p.R760C y p.R763G, cuyo resultado es la persistencia del VWFpp, lo que impide la unión del FVIII al VWF y que se hereda en modo dominante<sup>(46)</sup>.

#### **Mutaciones de novo**

La publicación de mutaciones *de novo* en VWD es muy limitada; se conocen pocos trabajos publicados, asociados al VWD2B<sup>(47)</sup>, VWD2A<sup>(48)</sup> y VWD tipo 1 Vicenza<sup>(49)</sup>. En nuestra casuística, hemos hallado cuatro mutaciones que se han determinado como *de novo*: p.V1316M, p.S1310F (ambas VWD2B), p.Y1542D (VWD2A) y p.R1205H (tipo 1 Vicenza), ésta última en asociación con la p.R924Q<sup>(50)</sup>, la cual describimos asociada a FVIII disminuido<sup>(51)</sup>. Para verificar paternidad, se estudian las variantes alélicas benignas, que son muy comunes en todos los grupos étnicos, mediante el estudio del haplotipo. Cuando la mutación responsable del fenotipo no está presente en ninguno de los progenitores, se considera que presentación de la mutación es *de novo*. Para determinar si se trata de una mutación en la línea germinal o se trata de mosaicismo (post cigoto) de bajo grado y no demostrable por análisis

del ADN de sangre periférica en los progenitores, la estrategia es buscar en los mismos la mutación causal en el ADN proveniente de otros tejidos (piel,

semen, orina, mucosa bucal).

Una reseña de las mutaciones según las variantes se detalla en la **tabla 2**.

**Tabla 2.** Tipo de mutaciones según la variante de enfermedad de von Willebrand

Variante	Herencia	Localización	Tipo de mutación
VWD1	Dominante / recesiva.	Todo el gen.	Sentido equivocado. Baja penetrancia. Sólo VWF<30 UI/dL.
VWD1C	Dominante?	D3 (Vicenza), A1-A2.	Sentido equivocado.
VWD3	Recesiva.	Todo el gen.	Alelos nulos, sin sentido, ins/del, heterocigotas compuestos. Grandes deleciones (homocigotas).
VWD2A	Dominante.	D2, A2, CK.	Sin sentido. Alta penetrancia. Dominio D2: ↓ multimerización (VWD2A1). Dominio A2: ↑ proteólisis (VWD2A2). CK: ↓ dimerización.
VWD2B	Dominante.	A1.	Sentido equivocado. Alta penetrancia.
VWF2M	Dominante.	A1, A3.	Sentido equivocado. Alta penetrancia.
VWD2N	Recesiva?	D'-D3.	Sentido equivocado. Baja penetrancia.

### Análisis de predicción in silico

Las herramientas de predicción *in silico* están siendo usadas cada vez más. El objetivo de estos programas es identificar el daño producido o no por un cambio de nucleótido y cómo este cambio afecta o no la estructura y función de la proteína en estudio y, por ende, el fenotipo. Utilizando estos programas, se podría reducir el número de ensayos funcionales requeridos<sup>(52)</sup>. Son una herramienta muy útil para la caracterización de nuevas sustituciones nucleotídicas, cuando los estudios de expresión son difíciles de realizar. Los más difundidos son: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) y SIFT (*Sorting Intolerant from Tolerant*) (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>).

### Análisis de alineamiento

Dado que el VWF está altamente conservado en un alto número de especies, frente a la presencia de cambios nucleotídicos no previamente descritos, se realiza el alineamiento del exón afectado del VWF humano con el de otras especies. Si la posición en estudio se corresponde con un residuo altamente conservado a lo largo del árbol filogenético, es altamente improbable que dicha posición tolere sustituciones sin cambios en las características funcionales del VWF. Existen diversas aplicaciones informáticas, como UniProt KB (<http://www.uniprot.org>).

### Secuenciación de nueva generación [Next Generation Sequencing (NGS)]

El análisis genético del *VWF* está lejos de ser un procedimiento de rutina, por su alto costo, el gran tamaño del gen y la dificultad que plantea la presencia del pseudogen. Se ha empezado a utilizar esta metodología NGS recientemente<sup>(53,54)</sup>, con menores costos y mayor rapidez en la caracterización de gran número de muestras. Esto hace que esta plataforma prometa ser una herramienta muy útil en un futuro cercano, para aplicar al estudio de grupos familiares o de poblaciones bien definidas.

### Conclusiones y perspectivas

La genética sólo influye entre el 60-70% de la variación de los niveles del VWF, siendo el 30% restante producido por causas epigenéticas, como el grupo sanguíneo ABO, edad, factores raciales y hormonales. Desafortunadamente, el gran tamaño del gen *VWF* y la alta frecuencia de variaciones (SNP) no patológicas limitan la utilidad del diagnóstico genético. No todos los pacientes tienen mutaciones identificables, en especial los VWD tipo 1, donde la presencia de mutaciones sería más común en pacientes con VWF:Ag < 20-39 UI/dL<sup>(32)</sup> y donde la mayoría de las mutaciones demuestran penetrancia incom-

pleta. La misma disminuye a medida que aumentan los niveles del VWF, de modo que la interpretación de cómo contribuye o no una variante a los síntomas es un desafío, por lo que se recomienda cautela en el análisis genético en pacientes VWD tipo 1<sup>(55)</sup>.

El análisis genético es fundamental para confirmar el diagnóstico de VWD2B vs. PT-VWD y VWD2N vs. hemofilia A (leve-moderada), o diferenciar VWD congénito de la forma adquirida (AVWS) con fenotipo 2A o 2B, donde la búsqueda de mutaciones responsables dará negativa. Permite identificar variantes de VWD2 localizadas, en general en regiones determinadas del ADN complementario. También es útil en el momento de la toma de decisiones terapéuticas frente a casos severos, donde es de mucha ayuda estudiar el grupo familiar para establecer grados de penetrancia de las mutaciones responsables. En los pacientes tipo 3 podría ser útil para consejos genéticos, estudios prenatales y predecir el desarrollo de inhibidores en caso de presencia de grandes deleciones del gen.

Lo novedoso en este campo es su contribución a la resolución de casos de difícil diagnóstico, lo cual probablemente arroje una nueva luz para simplificar la actual clasificación de la VWD.

#### **Declaración de conflictos de interés:**

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés.

#### **Bibliografía**

1. Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA. Substructure of human von Willebrand factor. *J Clin Invest*, 1985; 76: 1491-1500.
2. Furlan, M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol*, 1996; 72: 341-348.
3. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 1989; 264: 19514-19527.
4. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry*, 1991; 30: 253-269.
5. Sutherland MS, Cumming AM, Bowman M, Bolton-Maggs PH, Bowen DJ, Collins PW, Hay CR, Will AM, Keeney S. A novel deletion mutation is recurrent in von Willebrand disease types 1 and 3. *Blood*, 2009; 114: 1091-1098.
6. Keller L, Woods AI, Kempfer AC, Farias CE, Grosso N, Lazzari MA. Validación del Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) como método de screening del exón 22 del factor von Willebrand en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand (VW) 2N. *Medicina (Bs As)*, 2005; 65 (supl II) (a 65).
7. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwi-jnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002; 30:e57.
8. Schneppenheim R, Castaman G, Federici AB, Kreuz W, Marschalek R, Oldenburg J, Oyen F, Budde U. A common 253-kb deletion involving VWF and TMEM16B in German and Italian patients with severe von Willebrand disease type 3. *J Thromb Haemost*, 2007; 5: 722-728.
9. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood*, 1987; 69: 454-459.
10. Werner EJ, Broxson EH, Tucker EL, Giroux DS, Shults J, Abshire TC. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. *J Pediatr*, 1993; 893-898.
11. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, Morateck PA, Wren JS, Scott JP, Montgomery RR. Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *J Thromb Haemost*, 2009; 7: 1832-1837.
12. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, Christopher-son PA, Friedman KD, Haberichter SL, Branchford BR, Hoffmann RG, Abshire TC, Di Paola JA, Hoots WK, Leissinger C, Lusher JM, Rag-

- ni MV, Shapiro AD, Montgomery RR. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. *Blood*, 2010; 116: 280-286.
13. Bellissimo DB, Christopherson PA, Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Haberichter SL, Shapiro AD, Abshire TC, Leissinger C, Hoots WK, Lusher JM, Ragni MV, Montgomery RR. VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood*, 2012; 119: 2135-2140.
  14. Wang QY, Song J, Gibbs RA, Boerwinkle E, Dong JF, Yu FL. Characterizing polymorphisms and allelic diversity of von Willebrand factor gene in the 1000 Genomes. *J Thromb Haemost*, 2013; 11: 261-269.
  15. Davies JA, Bowen DJ. The association between the L1565 variant of von Willebrand factor and susceptibility to proteolysis by ADAMTS13. *Hematologica*, 2007; 92: 240-243.
  16. Pruss CM, Notley CR, Hegadorn CA, O'Brien LA, Lillicrap D. ADAMTS13 cleavage efficiency is altered by mutagenic and, to a lesser extent, polymorphic sequence changes in the A1 and A2 domains of von Willebrand factor. *Br J Haematol*, 2008; 143: 552-558.
  17. Marti T, Rösselet SJ, Titani K, Walsh KA. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* 1987; 26: 8099-109. *Biochemistry*, 1987; 26: 8099-8109.
  18. Purvis AR, Gross J, Dang LT, Huang RH, Kapadia M, Townsend RR, Sadler JE. Two Cys residues essential for von Willebrand factor multimer assembly in the Golgi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104: 15647-15652.
  19. Woods AI, Sanchez-Luceros A, Kempfer AC, Powazniak Y, Calderazzo Pereyra JC, Blanco AN, Meschengieser SS, Lazzari MA. C1272F: a novel type 2A von Willebrand's disease mutation in A1 domain; its clinical significance. *Haemophilia*, 2012; 18: 112-116.
  20. Schooten CJ, Tjernberg P, Westein E, Terraube V, Castaman G, Mourik JA, Hollestelle MJ, Vos HL, Bertina RM, Berg HM, Eikenboom JC, Lenting PJ, Denis CV. Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance. *J Thromb Haemost*, 2005; 3: 2228-2237.
  21. Woods AI, Kempfer AC, Paiva J, Blanco A, Chuit R, Casinelli MM, Sanchez-Luceros A, Lazzari M. Relationship between bleeding tendency and the affected domain with mutations responsible of VWD2M phenotype. *J Thromb Hemost*, 2015; 13 (Suppl S2):737 (a PO634 Tue).
  22. Sadler, JE. New concepts in Von Willebrand disease. *Annu Rev Med*, 2005; 56: 173-191.
  23. Interlandi G, Ling M, Tu AY, Chung DW, Thomas WE. Structural basis of type 2A von Willebrand disease investigated by molecular dynamics simulations and experiments. *PloS One*, 2012; 7: e45207.
  24. Wu T, Lin J, Cruz MA, Dong Jf, Zhu C. Force-induced cleavage of single VWF A1A2A3 tridomains by ADAMTS-13. *Blood*, 2010; 115: 370-378.
  25. Zhang Q, Zhou YF, Zhang CZ, Zhang X, Lu C, Springer TA. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009; 106: 9226-31.
  26. Keeling D, Beavis J, Marr R, Sukhu K, Bignell P.A family with type 2M VWD with normal VWF:RCO but reduced VWF:CB and a M1761K mutation in the A3 domain. *Haemophilia*, 2012; 18: e33.
  27. Tjernberg P, Vos HL, Spaargaren-van Riel CC, Luken BM, Voorberg J, Bertina RM, Eikenboom J. Differential effects of the loss of intra-chain- versus interchain-disulfide bonds in the cystine-knot domain of von Willebrand factor on the clinical phenotype of von Willebrand disease. *Thromb Haemost*, 2006; 96: 717-724.
  28. Katsumi A, Tuley EA, Bodó I, Sadler JE. Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 2000; 275: 25585-25594.
  29. Chen JM, Cooper DN, Chuzhanova N, Férec C, Patrinos GP. Gene conversion: mechanisms,



- evolution and human disease. *Nat Rev Genet*, 2007; 8: 762-775.
30. Goodeve, AC. Vicenza deciphered: modeling the von Willebrand disease enigma: commentary on accelerated clearance alone explains ultralarge multimers in VWD Vicenza. *J Thromb Haemost*, 2010; 8: 1271-1272.
  31. Roberts JC, Morateck PA, Christopherson PA, Yan K, Hoffmann RG, Gill JC, Montgomery RR, y Zimmerman Program Investigators. Rapid discrimination of the phenotypic variants of von Willebrand disease. *Blood*, 2016; 127: 2472-2480.
  32. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Habart D, Vorlova Z, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Hashemi Soteh M, Baronciani L, Hallden C, Guilli. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood*, 2007; 109: 112-121.
  33. Woods AI, Sánchez-Luceros A, Meschengieser SS, Kempfer AC, Blanco AN, Lazzari MA. Diagnosis and management of von Willebrand disease in a single institution of Argentina. *Sem Thromb Hemost*, 2011; 37:568–575.
  34. Kasatkar P, Shetty S, Ghosh K. Genetic heterogeneity in a large cohort of Indian type 3 von Willebrand disease patients. *PloS One*, 2014; 9: e92575.
  35. Castaman G, Bertoncello K, Bernardi M, Eikenboom JC, Budde U, Rodeghiero F. Autosomal recessive von Willebrand disease associated with compound heterozygosity for a novel nonsense mutation (2908 del C) and the missense mutation C2362F: definite evidence for the non-penetrance of the C2362F mutation. *Am J Hematol*, 2007; 82: 376-380.
  36. Hommais A, Stépanian A, Fressinaud E, Mazurier C, Meyer D, Girma JP, Ribba AS. Mutations C1157F and C1234W of von Willebrand factor cause intracellular retention with defective multimerization and secretion. *J Thromb Haemost*, 2006; 4: 148-157.
  37. Hommais A, Stépanian A, Fressinaud E, Mazurier C, Pouymayou K, Meyer D, Girma JP, Ribba AS. Impaired dimerization of von Willebrand factor subunit due to mutation A2801D in the CK domain results in a recessive type 2A subtype IID von Willebrand disease. *Thromb Haemost*, 2006; 95: 776-781.
  38. O'Brien LA, Sutherland JJ, Weaver DF, Lillcrap D. Theoretical structural explanation for Group I and Group II, type 2A von Willebrand disease mutations. . *J Thromb Haemost*, 2005; 3: 796-797.
  39. Kashiwagi T, Matsushita T, Ito Y, Hirashima K, Sanda N, Fujimori Y, Yamada T, Okumura K, Takagi A, Murate T, Katsumi A, Takamatsu J, Yamamoto K, Naoe T, Kojima T. L1503R is a member of group I mutation and has dominant-negative effect on secretion of full-length VWF multimers: an analysis of two patients with type 2A von Willebrand disease. *Haemophilia*, 2008; 14: 556-563.
  40. Michiels JJ, van Vliet HH. Dominant von Willebrand disease type 2A groups I and II due to missense mutations in the A2 domain of the von Willebrand factor gene: diagnosis and management. *Acta Haematol*, 2009; 121: 154-166.
  41. Lillicrap, D. Von Willebrand disease- Phenotype versus genotype: Deficiency versus disease. *Thromb Res* , 2007; 120: S1, S11–S16.
  42. Ozeki M, Kunishima S, Kasahara K, Funato M, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. A family having type 2B von Willebrand disease with an R1306W mutation: Severe thrombocytopenia leads to the normalization of high molecular weight multimers. *Thromb Res*, 2010; 125: e17-22.
  43. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, Baronciani L, Bucciarelli P, Canciani MT, Pecci A, Lenting PJ, De Groot PG. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood*, 2009; 113: 526-534.

44. Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2001; 14: 337-347. Review.
45. Carballo GA, Woods AI, Vera E, Casais P, Aletti G, Fariás C, Kempfer AC, Lazzari MA. Genetic study of von Willebrand factor in twenty-two members of an argentinian family. *J Thromb Haemost*, 2005; 3: suppl 1, a.863.
46. Casonato A, Sartorello F, Cattini MG, Pontara E, Soldera C, Bertomoro A, Girolami A. An Arg760Cys mutation in the consensus sequence of the von Willebrand factor propeptide cleavage site is responsible for a new von Willebrand disease variant. *Blood*, 2003; 101: 151-156.
47. Murray EW, Giles AR, Lillicrap D. Germ-line mosaicism for a valine-to-methionine substitution at residue 553 in the glycoprotein Ib-binding domain of von Willebrand factor, causing type IIB von Willebrand disease. *Am J Hum Genet*, 1992; 50: 199-207.
48. Holmberg L, Karpman D, Isaksson C, Kristoffersson AC, Lethagen S, Schneppenheim R. Ins405AsnPro mutation in the von Willebrand factor propeptide in recessive type 2A (IIC) von Willebrand's disease. *Thromb Haemost*. 1998 Apr;79(4):718-22.
49. Lester WA, Guilliatt AM, Surdhar GK, Enayat SM, Wilde JT, Willoughby S, Grundy P, Cumming AM, Collins PW, Hill FG. Inherited and de novo von Willebrand disease 'Vicenza' in UK families with the R1205H mutation: diagnostic pitfalls and new insights. *Br J Haematol*, 2006; 135: 91-96.
50. Woods AI, Kempfer AC, Sánchez-Luceros A, Calderazzo JC, Grosso SH, Lazzari MA. Clinical profile of the association of P.R1205H and P.R924q in a patient with von Willebrand's disease. *Haemophilia*, 2013; 19: e180-1.
51. Casais P, Carballo GA, Woods AI, Kempfer AC, Farias CE, Grosso SH, Lazzari MA. R924Q substitution encoded within exon 21 of the von Willebrand factor gene related to wild bleeding phenotype. *Thromb Haemost* 2006; 96:228-230.
52. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*, 2001; 11: 863-864.
53. Corrales I, Catarino S, Ayats J, Arteta D, Altisent C, Parra R, Vidal F. High-throughput molecular diagnosis of von Willebrand disease by next generation sequencing methods. *Haematologica*, 2012; 97: 1003-1007.
54. Goodeve AC. VWF sequence variants: a data goldmine. *Blood*, 2013; 122: 471-473.
55. Keeney S, Bowen D, Cumming A, Enayat S, Goodeve A, Hill M, y UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO). The molecular analysis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Haemophilia Genetics Laboratory Network. *Haemophilia*, 2008; 14: 1099-1111.